

Az NF 68563 számú támogatás szakmai beszámolója

Kutatásunk elsődleges célja plazmamembránban található foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát (PtdInsP₂) jelentőségének vizsgálata, ezen belül a G fehérjéhez kapcsolt receptor internalizáció szabályozásában betöltött esetleges szerepének kimutatása volt. Ehhez az általunk korábban kidolgozott, úgynevezett PtdInsP₂ depléciós rendszert használtuk, amely a rapamicin-függő heterodimerizációs rendszer felhasználásával, egy 5-foszfátáz aktivitású enzim plazmamembránhoz irányításával a plazmamembrán PtdInsP₂ szintjének gyors és jelentős csökkenését hozza létre. További célként tűztük ki e rendszer fejlesztését egyrészt abba az irányba, hogy alkalmazásával lehetővé váljék más membránok inozitol lipid szintjének változtatása, másrészt pedig alkalmassá kívántuk tenni a heterodimerizációs rendszert intracelluláris sejtorganellek közötti kapcsolat akut létrehozására. Végezetül vállaltuk, hogy felépítünk egy sokoldalú, széles körben használható fluoreszcens képalkotó rendszert. Az említett célok teljesítésének érdekében, a munkatervnek megfelelően az alábbi eredményeket sikerült elérnünk:

1. A rapamicin-függő lipid depléciós rendszer fejlesztése

1.1 A Golgi membrán foszfatidilinozitol 4-foszfát (PtdIns(4)P) szintjének csökkentésére alkalmas rendszer kidolgozása

Az inozitol lipidek közül a Golgi membránban legnagyobb mennyiségben a foszfatidilinozitol 4-foszfát (PtdIns(4)P) van jelen. A lipid jelentőségének vizsgálatára, a korábban beállított plazmamembrán PtdInsP₂ depléciós rendszerből kiindulva, egy, a Golgi PtdIns(4)P csökkentésére alkalmas molekuláris rendszert kívántunk létrehozni. Ehhez az FRB domént a TGN38-as proteinhez kötöttük, míg 4-foszfátázként a Sac1 foszfátáz enzimaktivitásért felelős doménjét (2-516) használtuk. Ez utóbbit a korábbi gyakorlatnak megfelelően építettük be az FKBP-mRFP fúziós fehérjébe. A Golgi PtdIns(4)P szintjének változását a Golgi PtdIns(4)P szint mérésre specifikusan kifejlesztett OSH1 fehérje PH doménjének transzlokációjával ellenőriztük, és megállapítottuk, hogy rapamicin adásával csökkenthető a transz-Golgi PtdIns(4)P mennyisége. Tamas Balla munkacsoportjával (NIH, Bethesda, USA) végzett kollaboráció keretében megállapítottuk, hogy a Golgi membrán PtdIns(4)P mennyiségének csökkentése számos adapter fehérje Golgi lokalizációját gátolja (clathrin, GGA1, GGA2), illetve kimutattuk, hogy e gátlás következményeképpen a Golgi-plazmamembrán és Golgi-késői endoszóma útvonalakon keresztüli transzport is jelentősen csökkent. További eredmény, hogy a Golgi PtdIns(4)P szint csökkentése a plazmamembrán PtdInsP₂ mennyiségének érdemleges esését eredményezi, ami egyértelműen bizonyítja e két inozitol lipid kompartment kapcsolatát.

Közlemények:

- A. Balla, Y.J. Kim, **P. Varnai**, Z. Szentpetery, Z. Knight, K.M. Shokat, and T. Balla: *Maintenance of Hormone-sensitive Phosphoinositide Pools in the Plasma Membrane Requires Phosphatidylinositol 4-Kinase III α* , **MOL BIOL CELL**, 19(2): 711-21, 2008
- Szentpetery Z, **Varnai P**, Balla T.: *Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling*, **PNAS**, 107: 8225-8230, 2010

1.2 A plazmamembrán PtdInsP₂ depléciós rendszer fejlesztése

Az eredeti PtdInsP₂ depléciós rendszer két konstrukció együttes expresszióját teszi szükségessé, amelyek két külön plazmidban vannak kódolva. Bár a kotranszfekció során a két plazmid nagy valószínűséggel jut be ugyanazon sejtbe, a fehérjék expressziós aránya sejt és sejt

között jelentős eltérést eredményezhet, ami aztán nagymértékben befolyásolja a PtdIns P_2 depléció mértékét. Ezt a jelenséget, illetve az ebből adódó, változó mértékű lipid depléció kellemetlen következményét az egysejtes munkáink során folyamatosan észleltük. Megoldásként a rendszert olyan irányba terveztük fejleszteni, hogy legalább az expresszált fehérjék mennyiségének aránya minden sejtben állandó legyen. Ehhez a két fehérjét kódoló szekvenciákat egyetlen plazmidba, az IRES szekvenciát tartalmazó, úgynevezett bicisztronos vektorba építettük be. Változtatva a szekvenciák sorrendjét, végül sikerült olyan konstrukciót készíteni, amely esetében a tranziens transzekciót követően a sejtek egy részében megvalósult a rapamycin-függő PtdIns P_2 depléció, azonban az alacsony 5-foszfátáz expresszió következtében, még a legnagyobb expressziót mutató HEK293 sejt vonal esetében is, csak igen kis százalékban. Ezek a próbálkozások tehát nem eredményeztek megnyugtató, a stabil sejt vonal vagy genetikusan módosított állat készítését lehetővé tevő megoldást.

2. Sejtorganellek közötti kapcsolat rapamicin-függő kialakítása

A lipid depléciós rendszer fejlesztése során sikeresen megoldottuk a fehérjék különféle organellek citoplazmatikus felszínére (sejtmembrán, ER, mitokondrium, korai endoszóma, Golgi) történő irányítását. Felmerült, hogy abban az esetben, ha a rapamicin-függő heterodimerizációs rendszer két tagját, az FRB-t és az FKBP-t két külön membránhoz kötjük, rapamicin adásával vajon létrehozható-e kapcsolat az adott membránok, azaz különböző sejtorganellek között.

2.1 Plazmamembrán és endoplazmás retikulum közötti kapcsolat létrehozása

Elsőként a plazmamembrán belső felszínéhez irányított FKBP és az endoplazmás retikulum (ER) citoplazmatikus felszínéhez kötött FRB-vel próbálkoztunk. Rapamicin adását követően percek alatt jellegzetes foltok, jelentek meg, amelyekről konfokális vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az ER membrán és a plazmamembrán összefekvésnek feleltethetők meg. Ezzel a beavatkozással, az alkalmazott fehérjék méretére épülő becslés alapján, kb. 5 nm-es mesterséges kapcsolat jött létre a két membrán között. Megállapítottuk, hogy a fehérjékben az FRB/FKBP illetve a target szekvenciák közötti linker változtatásával ez a távolság akár 15 nm-re növelhető. A módszer igen hasznosnak bizonyult a kapacitív Ca²⁺ beáramlásért felelős STIM1 és Orai1 fehérjéket tartalmazó fehérjekomplex méretének megítélésében. E méret és a STIM1/Orai1 fehérjék feltételezett méretének összevetéséből arra következtettünk, hogy belső Ca²⁺ raktárak ürítése következtében kialakuló fehérjekomplex a STIM1 és Orai1 fehérjéken kívül egyéb fehérjéket is tartalmaz. A témakörön belül, a kapacitív Ca²⁺ influx szabályozásának vizsgálata során, ugyancsak a Balla laborral kollaborációban megállapítottuk, hogy a plazmamembrán PtdIns P_2 szintjének változása nincs hatással a kapacitív Ca²⁺ beáramlásra, azonban a plazmamembrán PtdIns(4) P tartalma fontos szerepet játszik annak szabályozásában.

Közlemények:

Varnai P, Toth B, Toth D, Hunyady L, Balla T.: *Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1*, **J BIOL CHEM**, 282: 29678-29690, 2007

Péter Várnai, László Hunyady and Tamas Balla: *STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry*, **TIPS**, 30(3): 118-28, 2008

Korzeniowski MK, Popovic MA, Szentpetery Z, **Varnai P**, Stojilkovic SS, Balla T: *Dependence of STIM1/Orai1 mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides*, **J BIOL CHEM**, 284: 21027-21035, 2009

2.2 Mitokondrium és ER, illetve mitokondrium és plazmamembrán közötti kapcsolat létrehozása

Az AKAP fehérje 34-63 aminosavainak felhasználásával a mitokondrium külső membránjának citoplazmatikus felszínéhez irányított FKBP és a plazmamembránhoz, valamint az ER-hoz kötött FRB alkalmazásával sikerült rapamycin-függő kapcsolatot létrehozni a mitokondriumok és az ER, illetve a mitokondriumok és a plazmamembrán között, amit elektronmikroszkópos felvételekkel is igazoltunk. Kimutattuk, hogy a kapcsolat kialakulása együtt jár a kapcsolat kialakításáért felelős fehérjék koncentrációjának ezekben az úgynevezett kontakt pontokban, ami egyben lehetővé tette, hogy kicserélve a fluoreszcens fehérjét a Ca^{2+} érzékeny fehérje szenzorral (pericam), ezekben a jól definiálható régiókban meghatározzuk a lokális Ca^{2+} koncentrációt. A megfelelő konstrukciók elkészítését követően maguk a Ca^{2+} mérések Dr. György Hajnóczky munkacsoportjával kollaborációban készültek (Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA). Megállapítottuk, hogy a mitokondrium és az ER közötti térben a Ca^{2+} koncentráció mikromoláris értéket ér el, így sikerült direkt módon bizonyítanunk a Ca^{2+} mikrodomének létezését. Megállapítottuk továbbá, hogy az organellek közötti távolság mértéke jelentősen befolyásolja a mitokondriális Ca^{2+} jel kialakulását. A távolság optimális értéke a fiziológiás körülmények között kimérhető távolság esetében van, a távolság csökkentésének hatására a jel csökken, aminek oka feltehetően az InsP_3 receptorok kiszorulása a két organellek kapcsolódásának területéről.

Közlemény:

Csordas G*, Varnai P*, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnoczky G: *Imaging Interorganellar Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface*, **MOLECULAR CELL**, 39: 121-132, 2010

* osztott első szerzőség

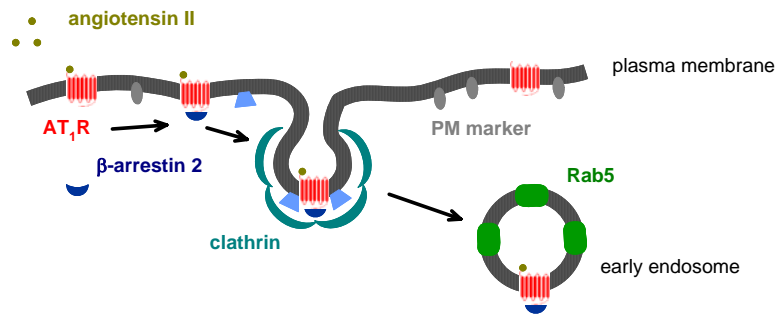
3. A G fehérjéhez kapcsolt receptorok internalizációjának lipid érzékenysége

Egy korábbi közleményben, amelyben leírtuk a plazmamembrán PtdInsP_2 depléciós rendszert, már bemutattuk, hogy a PtdInsP_2 szint csökkentésével gátolni lehet a transferrin és az EGF receptorok endocitózisát. Jelen pályázatban azt tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk, vajon a G fehérjéhez kapcsolt receptorok internalizációja esetében is megfigyelhető-e ez a hatás, illetve ha igen, akkor a folyamat mely lépéséhez szükséges a PtdInsP_2 . Modellként a Gq fehérjéhez kapcsolt 1-es típusú angiotenzin II receptort választottuk (AT1R), mivel Hunyady László professzor laborjában maga a receptor, illetve annak számos mutánsa is, illetve az AT1 receptort stabilan expresszáló HEK293 sejtvonal egyaránt rendelkezésre állt.

Az eredeti terveknek megfelelően az AT1R internalizációját, a transferrin és az EGF receptorok esetében is alkalmazott technikával, azaz fluoreszcensen jelölt ligand felhasználásával, a mennyiségi viszonyok pontos megítélését biztosító áramlásos citometriával terveztük követni. A kísérletekből azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy a különféle cégektől újabban beszerezhető fluoreszcensen jelzett angiotenzin-II egyre rosszabb minőségű, az áramlásos citometria során is olyan kis szignált ad, hogy abban egy eseteleges gátló hatás gyakorlatilag nem megítélhető, következésképpen más kísérleti megközelítést kellett kidolgozni.

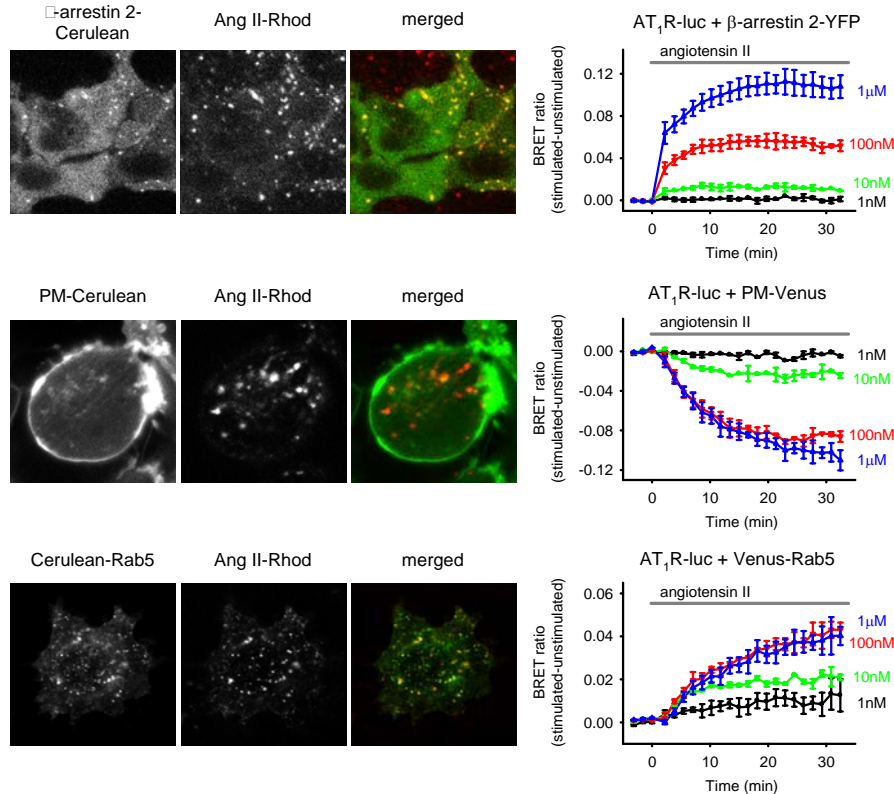
A fluoreszcens rezonancia energiatranszfer (FRET) és a biolumineszcens rezonancia energiatranszfer (BRET) módszerek fehérjék közötti molekuláris kölcsönhatások kimutatására alkalmasak. Tekintettel arra, hogy a laboratóriumban a BRET módszert az AT1 receptor és a β -arrestin 2 közötti interakció vizsgálatára korábban már beállítottuk, felmerült ennek a módszernek a kipróbálása. A receptort internalizációjának követése érdekében luciferáz enzimmel jelöltük, amely lehetővé teszi sárga fluoreszcens fehérjével (YFP vagy Venus) való közelségének detektálását. Az

internalizációs útvonal követésére a sejten belül bizonyos helyeket, így például magát a plazmamembránt (PM marker), a klatrin burkos vezikulákat és a korai endoszómákat (Rab 5) YFP-vel jelöltünk. Kontrollként az ugyancsak YFP-vel jelölt β -arrestin 2-t használtuk (1. ábra).



1. ábra A receptor endocitózis vizsgálatának sematikus ábrázolása

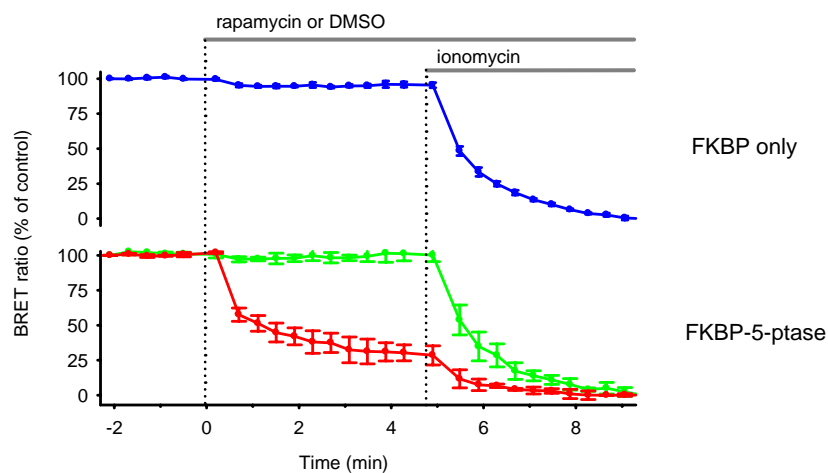
Amint az a 2. ábrán, a jobb oldali paneleken jól látszik, az így kialakított rendszer egyaránt alkalmas az AT₁ receptor és a β -arrestin 2 közötti kapcsolat, ingerlést követő, dózisfüggő kimutatására (a kapcsolat létrejöttét a BRET hányados emelkedése mutatja), valamint a receptor internalizációjának követésére. Ez utóbbi egyrészt a receptor és plazmamembránhoz kapcsolt fluoreszcens fehérjék közötti kapcsolat csökkenéséből (lefűződés), másrészt a receptor és a Rab5 molekulák közötti interakció emelkedéséből (receptor korai endoszómákba való megérkezése) egyaránt szépen látszik (középső és alsó panelek).



2. ábra Az endocitózis kimutatására alkalmazott konfokális mikroszkópia és a biolumineszcens energiatranszfer módszerek összehasonlítása HEK293 sejten.

A BRET mérésekkel kimutatott folyamatok, azaz a fluoreszcens angiotenzin II-vel láthatóvá tett receptor mozgása, a receptor és a β -arrestin 2 molekula, plazmamembrán, Rab 5 molekulák közötti kolokalizáció változásának kimutatásával, konfokális mikroszkópiával is követhető volt (2. ábra képek), azonban megjegyzendő, hogy a nagy számú sejt együttes méréséből származó BRET jel a folyamat kvantitatív követésére sokkal jobban alkalmazható, és statisztikailag is megbízhatóbb eredményt ad, így a munkát a BRET mérésekkel folytattuk.

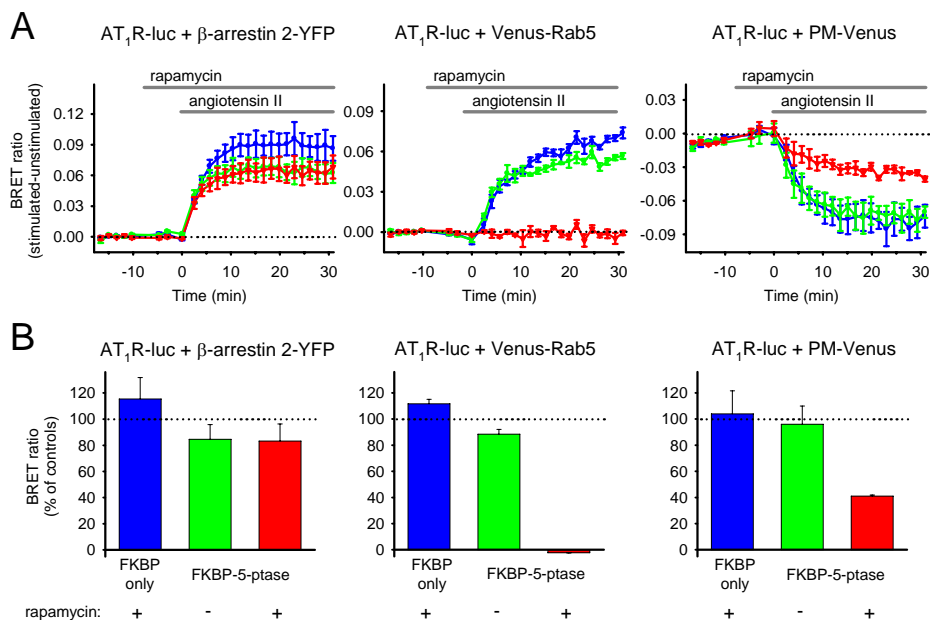
A következő, igen fontos állomás a PtdInsP_2 depléciós rendszer beállítása, pontosabban a PtdInsP_2 csökkenés mértékének BRET méréshez szükséges körülmények esetén bekövetkező mértékének ellenőrzése volt. Ehhez a plazmamembrán PtdInsP_2 szintjének változását BRET méréssel mutattuk ki oly módon, hogy elkészítettük a PtdInsP_2 -t specifikusan kötő $\text{PLC}\delta_1\text{PH}$ luciferázzal jelölt verzióját, amely a YFP-vel jelölt doménal együtt expresszáva képes alkalmas a plazmamembrán PtdInsP_2 szint detektálására. Amint az a 3. ábrán jól látszik, sikerült olyan körülményeket (transzfekció, fehérje expressziós arány) beállítani, hogy HEK293 sejtekben a PtdInsP_2 depléció megbízhatóan működjön. (Az ábrán a BRET hányados rapamycin adásra bekövetkező csökkenése a domének plazmamembránról való leesését, azaz a plazmamembrán PtdInsP_2 tartalmának csökkenését jelzi).



3. ábra A plazmamembrán PtdInsP_2 depléciós rendszer működésének ellenőrzése a BRET mérés körülményei között

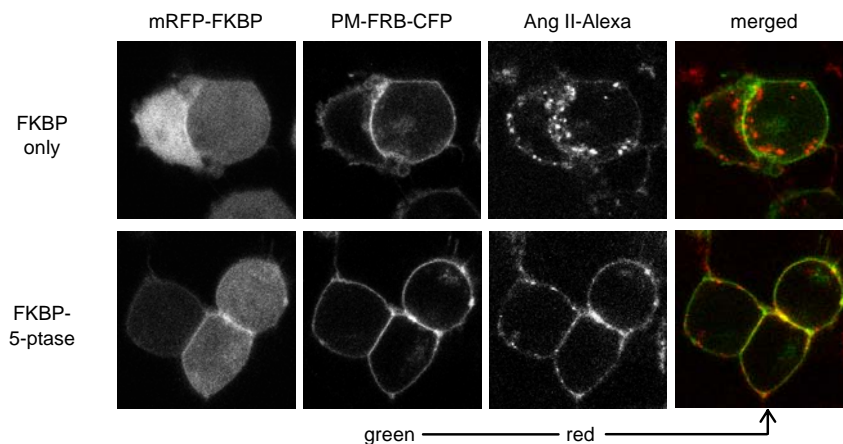
Mindezek után megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az AT1 receptor mozgását a plazmamembrán PtdInsP_2 depléció. A 4. ábrán a piros görbék, illetve a görbék statisztikai feldolgozását reprezentáló piros oszlopok a PtdInsP_2 depléciót követő változást mutatják, míg a fekete és kék szín/oszlop a kontroll állapotnak felelnek meg. Kontrollként egyrészt olyan felállást alkalmaztunk, amikor nem volt jelen a PtdInsP_2 hidrolízist katalizáló 5-foszfátáz (kék), másrészt egy olyan felállást, ahol ugyan jelen volt, de nem történt rapamycin kezelés (zöld). Mint látható, a PtdInsP_2 depléció a várakozásoknak megfelelően nem befolyásolja az AT1 és β -arrestin 2 közötti interakciót, azonban megfelelően munkahipotézisünknek, gyakorlatilag teljes mértékben gátolja a receptor korai endoszómákban való megjelenését, azaz az AT1 receptor internalizációját. Érdekes módon a plazmamembrántól való eltávolodás csak részben PtdInsP_2 érzékeny. Ugyanezeket a kísérleteket egy másik receptor, az ugyancsak Gq-t aktiváló 2C típusú szerotonin receptor esetében is elvégeztük, az eredmények tökéletesen egyeztek az AT1 receptor esetében tapasztaltakkal,

amennyiben a Venus-szal jelölt Rab 5 molekulával való interakció tökéletesen gátolható volt a PtdIns P_2 deplécióval, míg a plazmamembránhoz horgonyzott Venus és a receptor közötti kölcsönhatás csak részben bizonyult PtdIns P_2 érzékenynek.



4. ábra A plazmamembrán PtdIns P_2 depléció hatása az AT₁ receptor internalizációjára

A G fehérje kapcsolt receptorok internalizációjának fontos állomása az aktivált receptor molekulának a plazmamembrán klatrin burkos mikrodoménjében való megjelenése, majd a membrán lefűződése. Annak kimutatására, hogy a PtdIns P_2 depléció miként befolyásolja ezt a lépést, végül is a konfokális mikroszkópos vizsgálatok szolgáltatottak konkluzív adatokat. Ezekben a kísérletekben a receptort ismételten fluoreszcensen jelzett liganddal tettük láthatóvá. Amint azt az 5. ábra mutatja, a plazmamembrán PtdIns P_2 szint csökkentése esetén a receptorok normál PtdIns P_2 szint esetén kimutatható intracelluláris megjelenése (FKBP only) nyomokban sem volt kimutatható (FKBP-5-ptase), azonban ez a beavatkozás a receptorok csomósodását, azaz a klatrin burkos mikrodoménben való feldúsulását nem akadályozta meg (nyíl).



5. ábra A plazmamembrán PtdIns P_2 depléció hatása a fluoreszcensen jelzett angiotenzin II ligand (Ang II-Alexa) alkalmazásával ingerelt és egyben láthatóvá tett AT₁ receptor mozgására

Összefoglalva, kísérleteinkben két különböző G fehérjéhez kapcsolt receptor esetében (1-es típusú angiotenzin II és 2C-típusú szerotonin receptor) sikerült kimutatnunk, hogy internalizációjuk gátolható a plazmamembrán PtdInsP₂ szintjének csökkentésével. A gátlás mechanizmusára vonatkozóan megállapítottuk, hogy a PtdInsP₂ depléció nem akadályozza meg a receptorok plazmamembránon belüli mozgását, amit a plazmamembránhoz irányított fluoreszcens fehérje esetében tapasztalt részleges gátlás és a konfokális vizsgálatok egymást erősítve bizonyítanak. Ugyanakkor, a receptorok korai endoszómákba érkezése már nem következett be. Mindez azt jelenti, hogy a PtdInsP₂ hiány esetén a probléma a klatrin burkos membránok lefűződésének elégtelensége, és ennek következménye a folyamat gátoltsága.

Ezeket az eredményeket poszter és előadás formájában már bemutattuk, közlésük folyamatban van.

4. Képkalkoló rendszer építése és egyéb kollaborációs munkák

A terveknek megfelelően felépítettük a MetaFluor szoftver kontrolljával működő fluoreszcens rendszert. Ebbe fényforrásként sikerült integrálnunk a megévő PTI DeltaRAM-et, továbbá beépítésre került az úgynevezett DualView modul, melyek következtében a rendszer excitációs és emissziós ratio mérését igénylő fluoreszcens alkalmazások kivitelezésére egyaránt alkalmas. A képkalkoló rendszer váza egy Zeiss Observer D1 mikroszkóp, melyben a fontos részek (pl. filtercsere) motorizáltak. Ez a többsatornás mérés, a különféle beállításokat igénylő fluoroforok egyidejű követésének feltétele. Kameraként egy nagy érzékenységu EMCCD kamerát használunk (Photometrics CascadeII:512), a fűtéssel is ellátott csúcsobjektív pedig egy minden szempontból korigált 40x Plan-apo objektív. A képkalkoló rendszer egyrészt alapvetően fontos a fluoreszcensen jelölt konstrukciók kidolgozásában, működésük ellenőrzésében (pl. dimerizáció kimutatása), másrészt az egysejtes fluoreszcens rezonancia energiatranszfer (FRET) és a citoplazmatikus Ca²⁺ koncentráció mérésének lehetősége (Fura-2, pericam) más laborokkal való együttműködés kialakítását is eredményezte. A széleskörű hozzáférés biztosítására a rendszert a Semmelweis Egyetem Bioimaging hálózat részeként regisztráltuk az országos NEKIFUT rendszerben, ahol megkaptuk a stratégiai jelentőségű kutatási infrastruktúra (SKI) minősítést.

Közlemények:

- Hargitai D, Pataki A, Raffai G, Fuzi M, Danko T, Csernoch L, **Varnai P**, Szigeti GP, Zsembery A: *Calcium entry is regulated by Zn(2+) in relation to extracellular ionic environment in human airway epithelial cells*, **RESPIR PHYSIOL NEUROBIOL**, 170: 67-75, 2010
- Enyedí B, **Varnai P**, Geiszt M: *Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium*, **ANTIOXID REDOX SIGNAL**, 13(6): 721-9, 2010
- Turu G, **Varnai P**, Gyombolai P, Szidonya L, Offertaler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L: *Paracrine transactivation of the CB1 cannabinoid receptor by AT1 angiotensin and other Gq/11 protein-coupled receptors*, **J BIOL CHEM**, 284: 16914-16921, 2009